

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan pendekatan *post test only control group design*. Sebagai objek pada penelitian ini adalah tikus wistar dengan diet aterosklerotik. Perlakuannya adalah dengan pemberian variasi dosis ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca formatypica*) pada tikus yang diberi diet aterosklerotik.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat : Laboratorium Biomedik Universitas Muhammadiyah Malang

Waktu : 5 minggu

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*).

4.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain wistar*) dengan berat 150-200 gram dan berusia 2-3 bulan dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerakan yang aktif dan mata jernih.

4.3.3 Teknik pengambilan sampel

Sampel ini diambil dari populasi tikus putih jantan strain wistar (*Rattus norvegicus strain wistar*) sebagai hewan coba. Sampel terdiri atas 5 kelompok yang diambil secara random (*simple random sampling*).

4.3.4 Perhitungan besar sampel

Berdasarkan rumus Frederer, besar sampel penelitian memiliki nilai 1 agar mendapatkan data yang valid dan hasil optimal maka dilakukan replikasi sampel. Pada penelitian ini terdapat 4 kelompok perlakuan yaitu satu kelompok kontrol positif dan tiga kelompok perlakuan (tikus yang diberi ekstrak pisang kepok dosis 100 mg/kgBB/hari, 200 mg/kgBB/hari dan 400 mg/kgBB/hari). Estimasi besarnya sampel yang digunakan penelitian sesuai dengan rumus Federer, sebagai berikut :

$$(r-1)(p-1) \geq 15$$

$$(r-1)(4-1) \geq 15$$

$$(r-1)(3) \geq 15$$

$$3r - 3 \geq 15$$

$$r \geq 6$$

$$r \geq 6$$

Keterangan :

p = perlakuan

r = jumlah replikasi tiap perlakuan

sehingga dari rumus tersebut dapat disimpulkan jumlah tikus yang mnejadi replikasi sebanyak 6 ekor.

Besar sampel yang digunakan dihitung menggunakan Rumus *Resource Equation Methode* sebagai berikut:

$E = \text{jumlah total hewan coba} - \text{jumlah kelompok perlakuan}$

$E = (\text{jumlah replikasi} \times \text{jumlah kelompok perlakuan}) - \text{jumlah kelompok perlakuan}$

$E = (6 \times 4) - 4 = 20 \text{ ekor}$

Keterangan: $E = \text{besar sampel}$

Untuk mengantisipasi adanya tikus yang *drop out* selama penelitian, maka diperlukan adanya tikus cadangan dengan rumus koreksi besar sampel (Sastroasmoro & Ismael, 2011) sebagai berikut:

$$n' = [n / (1-f)]$$

keterangan :

n' = jumlah sampel penelitian

n = besar sampel yang dihitung

f = perkiraan proporsi drop out, kira-kira 20% ($f = 0,2$)

Jumlah sampel dalam penelitian ini adalah $(n') = 6 / (1-0,2) = 7.5 \approx 8$

Jumlah tikus cadangan = jumlah kelompok \times ($n' - \text{jumlah replikasi}$)

Jumlah tikus cadangan = $4 (8 - 6)$

Jumlah tikus cadangan = $4 \times 2 = 8 \text{ ekor}$

Keterangan:

n' = besar sampel terkoreksi

n = besar sampel minimum

f = perkiraan proporsi drop out, kira-kira 20% ($f = 0,2$)

Jadi jumlah sampel keseluruhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 28 ekor tikus. Keseluruhan tikus akan dibagi menjadi 4 kelompok dan tiap

kelompok terdiri atas 7 ekor tikus (5 ekor tikus sebagai sample perlakuan, 2 ekor tikus sebagai cadangan).

4.4 Karakteristik Sampel Penelitian

4.4.1 Kriteria inklusi :

1. Tikus putih jenis kelamin jantan
2. Umur 2-3 bulan
3. Berat badan 150-200 gram
4. Tikus dalam keadaan sehat, ditandai dengan gerakannya yang aktif, bulu yang tebal dan mata yang jernih

4.4.2 Kriteria drop out :

1. Tikus yang mati saat perlakuan
2. Tikus yang sakit saat perlakuan seperti menyendiri, gerak tidak aktif mata tidak bening, bulu berdiri dan kusam.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca forma typica*).

4.5.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung adalah jumlah Sel Busa (*Foam Cell*) pada Arkus Aorta Tikus Putih.

4.6 Definisi Operasional

- a. Ekstrak kulit pisang kepok merupakan ekstrak ethanol kulit pisang kepok yang dibagi dalam tiga dosis, yaitu 100mg/KgBB, 200mg/KgBB, dan 400mg/KgBB diberikan dengan metode sonde lambung sekali. Kulit pisang diekstraksi di Laboratorium biomedik FK UMM. Ekstrak akan disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 4°C (Depkes, 2000). Kulit pisang kepok didapatkan dari pasar merjosari Malang.
- b. Induksi aterosklerosis mengandung Comfeed PAR-S (50%), tepung terigu (25%), kuning telur bebek (5%), lemak kambing (10%), minyak kelapa (1%), dan asam kolat (0,1%) sebanyak 40 gram (Romadhoni, Sri, dyah, 2012).
- c. Jumlah sel busa yang ada di sel endotel perlapang pandang. Dilihat menggunakan mikroskop dengan *Software Optilab* pada perbesaran 400X (okuler 10X, obyektif 40X). Jumlah Foam Cell yang didapatkan dari sel endotel Arkus Aorta tikus putih dengan kriteria nilai (Jumlah sel/lapang pandang).

4.7 Alat dan bahan penelitian

4.7.1 Bahan dan Alat Penelitian

- a. Pakan standar BR-1 (air 12%, protein kasar 20-22%, lemak kasar $\geq 5\%$, abu $\leq 7,5\%$, Ca 0,9-1,2%, P 0,6-0,8%, coccidiostat positif, antibiotika positif) (Sholeh, 2011).
- b. Pakan tinggi kolesterol
- c. Kandang tikus individual
- d. Penutup kandang dari anyaman kawat
- e. Botol air minum

- f. Timbangan analitik Ohaus dengan ketelitian 0.0001 gr
- g. Tempat makan tikus
- h. Handscoun

4.7.2 Alat dan bahan bedah tikus

- a. Alat bedah minor
- b. Papan bedah
- c. *Handscoun*
- d. Jarum pentul
- e. Formalin 10% (Alexandru, 2011)

4.7.3 Alat pembuatan ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca formatypica*)

- a. Blender
- b. *microwave oven*
- c. etanol (1L)
- d. Gelas Erlenmeyer ukuran 1L
- e. Labu evaporasi ukuran 1L
- f. Labu penampung
- g. *Waterbath*
- h. *Rotary evaporator*
- i. Botol plastik
- j. *Freezer*

4.7.4 Alat lain

- a. Sonde modifikasi
- b. Kamera digital
- c. Botol film

- d. Neraca berat badan
- e. Spuit injeksi 3 ml
- f. Label

4.7.5 Bahan

- a. Air matang 100 ml
- b. kulit pisang kepok
- c. Pakan standar BR-1
- d. Pakan tinggi lemak

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Adaptasi

1. Menimbang berat badan tikus kemudian memberi tanda dengan spidol permanent sesuai dengan berat badannya.
2. Memasukkan tikus dalam kandang yang terbuat dari bahan yang mudah dibongkar pasang, yaitu dari bak plastik yang ditutup dengan kawat. Hal ini dimaksudkan agar tikus tampak dari luar, sehingga mudah dalam mengamati tikus dan mengambil tikus karena kandang dapat dibuka dan ditutup dengan mudah. Kandang diberi sekam sebagai alas tidur tikus, sehingga tikus merasa nyaman. Sekam sebagai alas tidur untuk tikus diganti setiap tiga hari sekali agar tidak kotor dan berbau. Kandang yang disiapkan sebanyak 5 tempat dan masing-masing diisi tikus sebanyak 5 ekor. Cara memasukkan yaitu dengan memegang badan tikus dan memasukkan satu persatu ke dalam kandang. Cara memasukkan tikus harus dengan hati-hati dan perlahan-lahan agar

tikus tidak merasa ketakutan dan stres karena takut dan stres dapat mempengaruhi kerja hormonal tikus.

3. Mengadaptasikan tikus (aklimatisasi) selama 7 hari dan selama masa ini tikus diberi makan BR-1. Makanan yang diberikan pada tikus sebanyak 40g/hari. jika ada sisa makanan maka sisanya dibuang lalu diganti dengan yang baru, serta diberi minum aquades.

4.8.2 Pembagian kelompok tikus

Tikus yang digunakan sebanyak 28 ekor yang terbagi menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok terdiri dari 8 ekor tikus :

- a. Kontrol positif : Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 40 g/hari/tikus serta minum *ad libitum* ditambah pakan tinggi kolesterol diencerkan dengan aquades, diberikan dengan metode sonde lambung sebanyak 2ml/200grBB/hari selama 5 minggu , tanpa pemberian ekstrak kulit pisang kepok
- b. Kelompok I: Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 40 g/hr/tikus serta minum *ad libitum* ditambah diet tinggi kolesterol sebanyak 2ml/200grBB/hari dan ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca formatypica*) dengan dosis 100 mg/kgBB/hr dengan metode sonde lambung sekali dalam sehari selama 5 minggu.
- c. Kelompok II: Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 40 g/hr/tikus serta minum *ad libitum* ditambah diet tinggi kolesterol sebanyak 2ml/200grBB/hari dan ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca formatypica*) dengan dosis 200 mg/kgBB/hr dengan metode sonde lambung sekali dalam sehari selama 5 minggu.

- d. Kelompok III: Diberi pakan standar BR-1 sebanyak 40 g/hr/tikus serta minum *ad libitum* ditambah diet tinggi kolesterol sebanyak 2ml/200grBB/hari dan ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca formatypica*) dengan dosis 400 mg/kgBB/hr dengan metode sonde lambung sekali dalam sehari selama 5 minggu.

4.8.3 Pemberian diet atherosklerosis

Comfeed PAR-S (50%), tepung terigu (25%), kuning telur bebek (5%), lemak kambing (10%), minyak kelapa (1%), dan asam kolat (0,1%) sebanyak 40 gram (Romadhoni,2012).

4.8.4 Dasar penentuan dosis

Dasar penghitungan dosis ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca formatypica*) adalah penelitian tentang “Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Pisang Ambon dan Kulit Pisang Kepok terhadap Kadar Kolesterol Total Tikus Putih Jantan Galur *Sparague Dawley*” dengan pemberian dosis sebesar 200 mg/kgbb menunjukkan penurunan kadar kolesterol (Berawi et al, 2013). Dosis yang digunakan berturut-turut dengan rumus $1/2n$, n , dan $2n$ dari dosis empiris :

- a. $1/2n = 1/2 \times 200 \text{ mg/kgbb} = 100 \text{ mg/kgBB}$
- b. $n = 200 \text{ mg/kgBB}$
- c. $2n = 2 \times 200 \text{ mg/kgbb} = 400 \text{ mg/kgBB}$

4.8.5 Pemberian ekstrak kulit pisang kepok

Dosis pemberian ekstrak kulit pisang kepok yang diberikan yaitu :

Dosis I : 100 mg/kgBB tikus/hari

Dosis II : 200 mg/kgBB tikus/hari

Dosis III : 400 mg/kgBB tikus/hari

4.8.6 Cara pembuatan ekstrak kulit pisang kepok

1. Kulit pisang kepok sebanyak 3 kg disortir dan dicuci bersih. Kemudian ditiriskan.
2. Kulit yang sudah dicuci kemudian dikeringkan dengan oven suhu 60°C selama 3 hari
3. Kulit yang sudah dikeringkan kemudian digiling dengan mesin penggiling dan ayakan *mesh* 80/100, didapatkan serbuk kulit pisang kepok sebanyak 1,2 kg.
4. Diambil 500 gram serbuk kulit pisang kepok, ditambahkan ethanol 96% sebanyak 1 liter, dicampur lalu dimasukkan toples. Ditambahkan lagi alkohol sampai serbuk terendam dengan tinggi cairan 3 cm di atas permukaan serbuk (total alkohol yang digunakan 1200ml). Toples ditutup rapat dan didiamkan selama 5 hari dan setiap hari diaduk rata tiap 3 jam.
5. Pada hari ke-5 disaring, lalu filtrat atau ekstrak cair ditampung.
6. Ampas dimasukkan dalam toples dan ampas direndam lagi dengan ethanol 96% sebanyak 1 liter, didiamkan semalaman dengan pengadukan berkala.
7. Filtrat ditampung lagi dan ampas direndam lagi dengan alkohol semalam. Proses ini diulang sampai ekstrak jernih (total 5 kali remaserasi 1/perendaman).
8. Seluruh ekstrak cair yang ditampung dijadikan satu lalu diuapkan dengan *rotary evaporator* suhu 60°C, tekanan 175 mmBar.

9. Ekstrak kental ditampung dalam cawan dan dibiarkan di atas pemanas sampai kental setengah pasta.

10. Ekstrak ditampung di dalam botol, hasil 500 gr serbuk kulit pisang kepok diperlukan pelarut ethanol 96% sebanyak 5200ml dan didapatkan ekstrak kental kulit pisang kepok 123,086 gr.

4.8.7 Proses anestesi dan pembedahan serta penguburan hewan coba

a. Proses anestesi :

Proses anestesi dilakukan satu persatu terhadap hewan coba yaitu dengan memasukan satu persatu hewan coba ke dalam toples kaca yang berisi kapas yang sudah dicampur dengan kloroform. Anestesi dilakukan secara inhalasi pada hewan coba dengan dosis eter $\pm 0,67$ ml/hewan coba selama ± 60 detik yang dihitung dengan menggunakan *stopwatch*.

b. Proses pembedahan

Setelah hewan coba teranestesi dengan baik (keadaan pingsan) dan ditandai dengan tidak adanya respon nyeri, hewan coba diletakkan pada meja lilin dan keempat kaki hewan coba difiksasi terhadap meja lilin dengan menggunakan jarum pentul. Dengan menggunakan gunting bedah, dilakukan pembedahan pada abdomen hingga setinggi leher. Kemudian dengan menggunakan spuit 5 ml, darah hewan coba diambil dari ventrikel kiri sebanyak ± 3 ml.

c. Penguburan tikus percobaan

Tikus yang telah diambil darah yang akan diteliti dipastikan mati, bangkai tikus diletakkan dalam wadah baskom. Bangkai tikus percobaan dikubur di tanah dengan kedalaman minimal 50 cm dan luas lubang 0,25 m². Setiap lubang hanya digunakan untuk mengubur 10 tikus secara bersama, hal ini untuk mencegah

bangkai tikus digali oleh hewan lain seperti kucing. Lubang ditutup kembali dengan tanah lalu lubang dipadatkan agar tidak tercium bau dari bangkai tikus tersebut.

4.8.8 Pembuatan sediaan

Pembuatan sediaan histopatologi dilakukan di Laboratorium Biomedik FKUMM oleh peneliti dengan supervisi dari ahli histopatologi. Cara membuat sediaan histopatologi adalah sebagai berikut (Sjamsuhidajat, 2010):

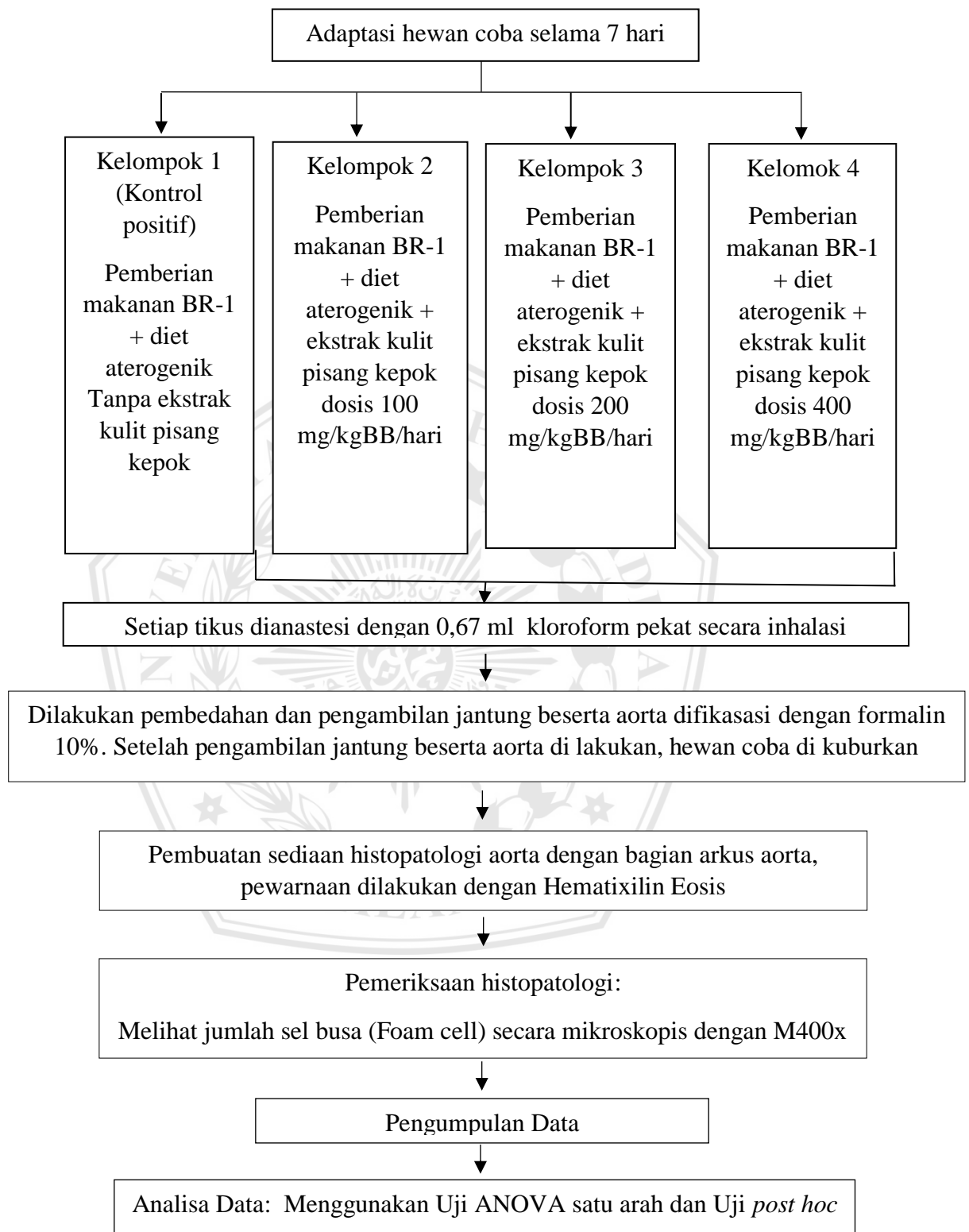
- a. Arkus aorta diambil dan difiksasi dalam larutan formalin 10% kemudian dipotong 3mm di distal perbatasan atrium dan ventrikel.
- b. Irisan tersebut diletakkan pada tabung organ dan difiksasi dengan formalin 10% selama 24 jam.
- c. Dilakukan dehidrasi dengan merendam pada alkohol bertingkat, yaitu pada konsentrasi 50%, 70%, 95% dan dua kali alkohol absolut masing-masing selama 30 menit.
- d. Dilakukan clearing dengan menggunakan alkohol dan xilol murni masing-masing selama 60 menit.
- e. Dilakukan proses infiltrasi dengan xilol-paraffin dengan perbandingan 1:3 selama 24 jam dan murni selama 1 jam pada suhu 46-52⁰C.
- f. Dilakukan *blocking* paraffin keras pada suhu 46-52⁰C selama 1 jam.
- g. Kemudian dipotong dengan mikrotom berukuran 2-5 milimikron dan potongan direkatkan pada kaca obyek.
- h. Dipanaskan pada suhu 46-52⁰C di dalam inkubator (24jam).
- i. Dilakukan deparafinisasi (perendaman dengan xilol dua kali alkohol absolut 95% dan H₂O masing-masing selama 3 menit).

- j. Dibuat 1 slide untuk setiap tikus sehingga akan akan 25 slide dari 25 ekor tikus.
- k. Dilakukan pewarnaan hematoxilin eosin dengan langkah-langkah sebagai berikut :
 - 1. Pemberian Haris Hematoxilen selama 15 detik.
 - 2. Eosin staining selama 15-20 menit.
 - 3. Dehidrasi pada alkohol bertingkat 50%, 70%, 85%, 95% dan dua kali alkohol absolut.
 - 4. Pemberian xilol selama 5 menit.
 - 5. Mounting menggunakan perekat entelan.
 - 6. Panaskan suhu 46-52⁰C dalam inkubator selama 24 jam.

4.8.9 Pengamatan Sediaan

Pengamatan sediaan dilakukan dengan melihat jumlah *foam cell* pada tunika intima arkus aorta tikus tiap sampel pada masing-masing kelompok. dengan perbesaran 400x pada arkus aorta setiap sampelnya secara mikroskopis dan random (Tjarta, 2007).

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.10 Analisis data

Data-data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisa menggunakan uji normalitas, uji homogenitas, uji *one way* ANOVA, uji Korelasi, uji Regresi yang pengolahannya menggunakan program komputerisasi SPSS 21.0

a. Uji *One Way* ANOVA

Sebelum melaksanakan Uji *One Way* ANOVA dilakukan uji Homogeneity of variance dan uji normalitas. Kedua uji ini digunakan sebagai syarat untuk melakukan Uji *One Way* ANOVA. Selanjutnya untuk membandingkan *mean* dari 2 kelompok percobaan atau lebih, dengan tingkat kepercayaan $\alpha=0,05$, dimana apabila diperoleh $\alpha>0,05$ artinya tidak ada perbedaan yang bermakna sebaliknya bila $\alpha<0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna.

b. Uji *Post Hoc* Bonferroni

Merupakan uji kelanjutan dari uji *One way* ANOVA, digunakan untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antar masing-masing kelompok perlakuan dalam penelitian. Jika varian data berbeda maka digunakan uji *Post Hoc* Tamhane's.

c. Uji Korelasi Spearman

Untuk mengetahui hubungan yang signifikan antar dosis ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca forma typica*).

d. Uji Regresi Linier

Sederhana digunakan untuk mengetahui seberapa kuat hubungan yang didapat dari analisa korelasi dan untuk mengetahui seberapa kuat pengaruh antar dosis ekstrak kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca forma typica*) dengan perlakuan.